

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/435, A01N 63/02, A61K 38/17	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/30082	(43) Date de publication internationale: 21 août 1997 (21.08.97)
--	----	--	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00295

(22) Date de dépôt international: 17 février 1997 (17.02.97)

(30) Données relatives à la priorité:
96/02168 16 février 1996 (16.02.96) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14/20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BULET, Philippe [FR/FR]; 11, rue du Cottage, F-67550 Vendenheim (FR). HETRU, Charles [FR/FR]; 5, rue des Moineaux, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR). SABATIER, Laurence [FR/FR]; 8, rue des Vergers, F-67120 Molsheim (FR).

(74) Mandataire: CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie - D.P.I., 14/20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).

(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

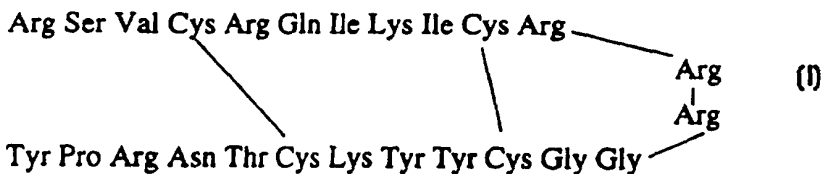
Sans rapport de recherche internationale. sera republiée dès réception de ce rapport.

(54) Title: ANTIFUNGIC AND ANTIBACTERIAL PEPTIDE

(54) Titre: PEPTIDE ANTIBACTERIEN ET ANTIFONGIQUE

(57) Abstract

The invention discloses an antibacterial and antifungic peptide having the formula (I).



(57) Abrégé

Peptide antibactérien et antifongique de la formule (I), utilisable comme antibactérien et antifongique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Peptide antibactérien et antifongique

5

La présente invention a pour objet un nouveau peptide riche en protéines ayant des propriétés antibactériennes et antifongiques, des compositions utilisables en agriculture et en thérapie humaine ou animale contenant ce peptide comme matière active. L'invention concerne également des procédés de traitement des plantes à l'aide de ces compositions ainsi que des procédés de préparation de ce peptide.

On sait de longue date que les insectes présentent une résistance efficace contre les bactéries. Cette défense est pour une large part basée sur la synthèse rapide de plusieurs familles de peptides. Cette défense est due à la synthèse rapide de plusieurs familles de peptides à large spectre d'activité. Cette synthèse est induite par une blessure septique ou par l'injection d'une faible dose de bactéries. Parmi les peptides antibactériens induits, les mieux caractérisés sont les cécropines et les défensines d'insectes. Plusieurs autres peptides antibactériens ont été partiellement caractérisés.

A côté de la classe des insectes peu de choses sont connues concernant d'autres arthropodes. Les scorpions sont des animaux plus anciens que les insectes au niveau philogénique.

Il a maintenant été isolé, à partir d'une induction chez le scorpion *Androctonus australis*, un peptide, qui présente des caractéristiques remarquables ainsi que des propriétés antibactériennes et antifongiques.

Plus particulièrement un premier aspect de l'invention concerne le peptide de formule I:

Arg Ser Val Cys Arg Gln Ile Lys Ile Cys Arg

Arg

Arg

Tyr Pro Arg Asn Thr Cys Lys Tyr Tyr Cys Gly Gly

Dans la suite, la molécule de formule I sera appelée androctonine. Cette molécule, de taille réduite, comporte de 4 résidus cystéine engagés dans deux ponts intramoléculaires.

Un autre aspect de l'invention concerne un premier procédé pour l'obtention et l'isolement du peptide ci-dessus, qui est caractérisé en ce que successivement:

a) on prélève de l'hémolymphe du scorpion *Androctonus australis* ;

2

b) on effectue l'extraction par mise en contact d'hémolymph de *Androctonus australis* obtenue précédemment avec un milieu acide sous agitation,

puis par centrifugation;

c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules

5 hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés sur colonne séparatrice

d) on purifie les extraits.

e) on caractérise le peptide.

10 L'hémolymph est prélevée par incision cuticulaire. Elle est recueillie dans un tube contenant un inhibiteur de protéase. Après centrifugation pour éliminer les cellules sanguines, le plasma est stocké à -30°C.

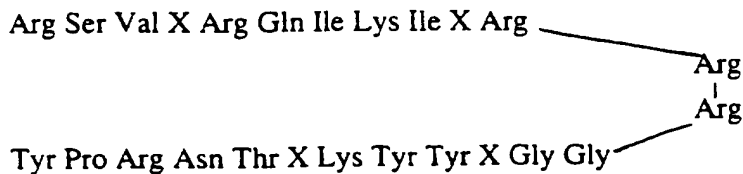
De manière préférée la seconde étape (extraction) on met en contact l'hémolymph de *Androctonus australis* avec un milieu acide, constitué d'une solution
15 acide d'un acide (de pH de 2). La solution peut être une solution d'un acide minéral ou organique comme par exemple d'acide trifluoroacétique. L'extrait obtenu est ensuite centrifugé à froid à une vitesse de 30.000 g à 4°C, pendant 25 min.

De manière préférée la troisième étape (fractionnement), l'extrait est déposé sur une cartouche de phase inverse pour réaliser une extraction en phase solide. Le lavage
20 des molécules solubles dans l'eau est effectué avec une solution acide diluée et l'élution des molécules hydrophobes avec un éluant approprié. On obtient de bons résultats avec de l'acide trifluoroacétique pour le lavage et un éluant contenant des quantités croissantes d'acétonitrile en solution acide diluée.

De manière préférée la quatrième étape (purification) est effectuée avec un
25 éluant convenable qui peut être différent ou identique à celui de la phase précédente.

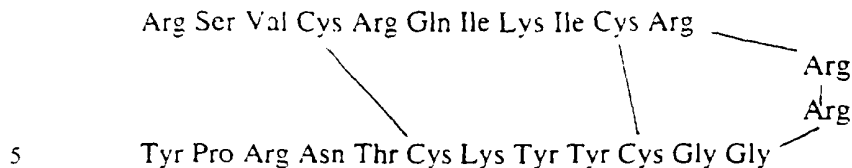
De manière préférée, dans la dernière étape (caractérisation), la nature du peptide est analysée selon la méthode de séquençage par dégradation d'Edman (Acta Chemica Scandinavia 10 (1956) p; 761-768). Selon cette méthode on obtient les structures suivantes:

30



35

Aucun signal n'était détectable dans les positions 4, 10, 16 et 20. (dégradation d'Edman). La présence de cystéines dans ces positions a été montrée par spectrométrie de masse, la structure alors obtenue étant la suivante:



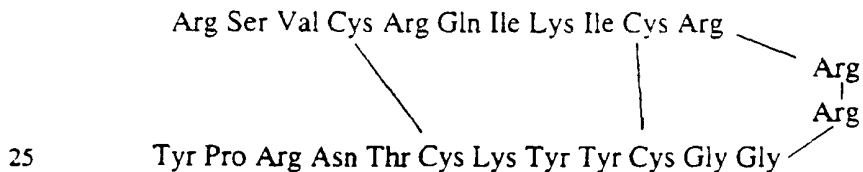
Les masses mesurées de l'androctonine ci-dessus sont respectivement de :
 $3076,65 \pm 0,24$ Da;

10 Or les masses calculées sur la base des données de séquence sont respectivement
 de: $3080,65 \pm 0,24$ Da;

Le défaut de masse correspond à la formation de deux pont disulfure
 intramoléculaires.

Afin d'établir la connectivité des ponts disulfure, la molécule a été clivée par une
 enzyme, l'endoprotéinase Lys-C, qui rompt la chaîne peptidique après la lysine. Les
 15 peptides obtenus ont été isolés et la spectrométrie de masse a montré qu'il s'agissait de
 deux peptides liés par un pont disulfure. Les séquences déduites étaient Arg Ser Val
 Cys Arg Gln Ile Lys plus Cys Thr Asn Arg Asn Pro Tyr et Ile Cys Arg Arg Arg Gly
 Gly Cys Tyr Tyr.

20 La connectivité des ponts disulfure est ainsi établie et la cystéine 1 est liée à la
 cystéine 4, la cystéine 2 à la cystéine 3. Ce résultat peut être schématisé ainsi:



Ces bonnes corrélations confirment les séquences proposées.

30 Les peptides selon l'invention peuvent également être obtenus sans difficulté selon
 un second procédé, par synthèse chimique FMOC (Atherton and Sheppard R.C. (1989),
 Solid Phase Peptide Synthesis (IRL, Oxford, UK) suivie d'une renaturation dans une
 solution 100mM d'acétate d'ammonium à pH 8,5 pendant 24 h sous agitation à
 température ambiante. L'androctonine obtenue présente les mêmes propriétés
 chromatographiques que la molécule native et la connectivité des ponts disulfure est
 35 identique à celle de la molécule naturelle. La masse mesurée après renaturation ($3076,$
 $61 \pm 0,67$) est très semblable à celle de la molécule native. La molécule synthétique
 présente la même activité antibactérienne que la molécule native sur la bactérie
Micrococcus luteus.

L'ensemble des tests antibactériens et hémolytiques est réalisé avec la molécule synthétique.

1. L'androctonine ne présente aucun effet lytique sur des hématies de porc ou de boeuf.

5 2. Ces molécules ont des propriétés antibactériennes vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et à Gram positif (cf tableau 1), des bactéries phytopathogènes et des champignons phytopathogènes.

10 Les exemples suivants illustrent l'obtention et les propriétés antibactériennes des peptides et des compositions selon l'invention.

Exemple 1: Isolement et caractérisation du peptide

on procède selon les étapes suivantes:

- extraction et de purification :

15 L'hémolymph (3.8 ml) est prélevée par incision de la cuticule. Elle est transférée dans un tube maintenu au froid en présence d'un inhibiteur de protéases (aprotinine) puis centrifugée à 30.000 g pendant 25 minutes à 4°C. Le surnageant ainsi obtenu est immédiatement soumis aux différentes étapes de la purification.

Fractionnement de l'extrait sur cartouches Sep-Pak C18

20 Après dépôt de l'extrait sur des cartouches Sep-Pak C18, les molécules à caractère hydrophile sont éliminées par un simple lavage par 5 ml d'eau acidifiée à l'acide trifluoacétique (TFA) à 0,05%.

L'élution des molécules hydrophobes est réalisée avec des solutions à 10, 40 et 80% d'acétonitrile en eau acidifiée (TFA 0,05%, 5 ml par cartouche).

25 Les fractions recueillies sont dénommées "Elution 10%", "Elution 40%" et "Elution 80%" et concentrées sous vide. Les fractions sont ensuite reconstituées avec de l'eau qualité HPLC avant l'analyse en HPLC.

*Purification par HPLC des molécules à activité antibactérienne
première étape:*

30 La fraction "Elution 40%" est analysée sur une colonne de phase inverse Aquapore OD 300 C18 avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 52% dans l'eau acidifiée (TFA à 0,05%) en 90 minutes (soit une augmentation de 0,44% d'acétonitrile par minute) pour un débit de 1 ml/min.

35 Les fractions actives résultantes sont ensuite purifiées sur une colonne "High Pressure Inert" (HPI) Delta Pak C18 (150*3,9 mm).

L'élution est réalisée dans un gradient linéaire biphasique d'acétonitrile de 2 à 11% dans l'eau acidifiée (HCl 6mM) en 10 minutes et de 11 à 21% en 50 min à un débit de 1 ml/min. La pureté de la fraction active est contrôlée par électrophorèse capillaire

avant la détermination de la séquence par dégradation d'Edman et analyse en spectrométrie de masse.

Exemple 2: Test in vitro: Mesure de l'activité antibactérienne par microspectrophotométrie

Pour chaque souche de bactérie utilisée (E.coli ; M.luteus) une colonie isolée est mise en suspension dans 10 ml de milieu PB (Poor Broth, milieu Luria Bertani dépourvu d'extrait de levure) DIFCO et incubée à 30°C pendant une nuit sous agitation lente.

Les bactéries à tester sont ramenées à une densité optique à 600 nm de 0.001 dans un milieu de culture frais. On dépose 10µl de chaque fraction dans des plaques de microtitration en présence de 100 µl de la suspension bactérienne. Au bout de 24 heures d'incubation à 25°C, on évalue la croissance par la mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un lecteur de plaque de microtitration.

Dans ces conditions on observe une inhibition à 50% aux concentrations, exprimées en µM, indiquées dans le tableau suivant:

Tableau 1

	Gram +/-	androctonine e MIC (µM)
bactéries		
<i>Micrococcus luteus</i>	+	0,6-1,5
<i>Aerococcus viridans</i>	+	0,3-0,6
<i>Bacillus subtilis</i>	+	1,5-3,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	15-30
<i>Clavibacter michi ganensis</i>	+	6-15
<i>Escherichia coli D22</i>	-	>30
<i>Escherichia.coli D31</i>	-	3-6
<i>Escherichia.coli 1106</i>	-	6-15
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	3-6

En utilisant le même protocole mais avec des bactéries phytopathogènes, on obtient les résultats suivants:

Tableau 2

	androctonine MIC (μ M)
bactéries	
<i>Clavibacter michiganensis</i>	6-15
<i>Pseudomonas syringae</i>	0,5-1
<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>syringae</i>	15-22
<i>Pseudomonas pisi</i>	6-15
<i>Pseudomonas maculicola</i>	3-6
<i>Pseudomonas valerianella</i>	15-22
<i>Pseudomonas syr phaseoli</i>	2-4
<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i>	3-6
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> 687.3	1,5-3
<i>Xanthomonas vesicatoria</i> B229RI	1,5-3
<i>Xanthomonas phaseolica</i>	1-2

- 5 En utilisant le même protocole mais avec des champignons phytopathogènes, on obtient les résultats suivants:

Tableau 3

	androctonine MIC (μ M)	
champignons		
<i>Alternaria dauci</i>	4,1-8,2	16-32
<i>Stemphyllium</i>	4-8	16-32
<i>Fusarium oxysporum</i> L	2-4	> 32
<i>Verticilium toreillis</i>	2-4	> 32
<i>Botrytis petuniae</i>	4-8	> 32
<i>Fusarium oxysporum meloni</i>	2-4	-

- 10 * milieu supplémenté avec 1mM CaCl₂ et 20 mM KCl

Parmi les cultures pouvant faire l'objet d'un traitement antibactérien à l'aide d'un composé selon l'invention, on peut citer à titre d'exemples le riz, les céréales, notamment le blé et l'orge, ainsi que les plantes arboricoles, fruitières, légumières.

Parmi les cultures pouvant faire l'objet d'un traitement antifongiques à l'aide d'un composé selon l'invention, on peut citer, à titre d'exemples, les cucurbitacées, les cultures florales (pétunia), et les cultures maraîchères (carottes, tomates, choux).

5 Ces résultats montrent l'excellente activité antibactérienne du peptide selon l'invention, qui peut s'appliquer aux domaines humain, animal et végétal.

La présente invention a également pour objet des compositions, utilisables comme agents antibactériens, contenant comme matière(s) active(s) un (ou plusieurs) composé selon l'invention tel que décrit précédemment, en mélange avec les supports solides ou
10 liquides, acceptables en agriculture et les agents tensio-actifs également acceptables en agriculture. En particulier sont utilisables les supports inertes et usuels et les agents tensio-actifs usuels. Ces compositions recouvrent non seulement les compositions prêtes à être appliquées sur la culture à traiter au moyen d'un dispositif adapté, tel qu'un dispositif de pulvérisation, mais également les compositions concentrées commerciales
15 qui doivent être diluées avant application sur la culture.

Ces compositions peuvent contenir aussi toute sorte d'autres ingrédients tels que, par exemple, des colloïdes protecteurs, des adhésifs, des épaississants, des agents thixotropes, des agents de pénétration, des stabilisants, des séquestrants, etc... Plus généralement les composés utilisés dans l'invention peuvent être combinés à tous les
20 additifs solides ou liquides correspondant aux techniques habituelles de la mise en formulation.

D'une façon générale, les compositions selon l'invention contiennent habituellement de 0,05 à 95 % environ (en poids) d'un composé selon l'invention (appelé par la suite matière active), un ou plusieurs supports solides ou liquides et,
25 éventuellement, un ou plusieurs agents tensioactifs.

Par le terme "support", dans le présent exposé, on désigne une matière organique ou minérale, naturelle ou synthétique, avec laquelle le composé est combiné pour faciliter son application sur la plante, sur des graines ou sur le sol. Ce support est donc généralement inerte et il doit être acceptable en agriculture, notamment sur la plante
30 traitée. Le support peut être solide (argiles, silicates naturels ou synthétiques, silice, résines, cires, engrais solides, etc...) ou liquide (eau, alcools, notamment le butanol etc...).

L'agent tensioactif peut être un agent émulsionnant, dispersant ou mouillant de type ionique ou non ionique ou un mélange de tels agents tensioactifs. On peut citer par
35 exemple des sels d'acides polyacryliques, des sels d'acides lignosulfoniques, des sels d'acides phénolsulfoniques ou naphthalènesulfoniques, des polycondensats d'oxyde d'éthylène sur des alcools gras ou sur des acides gras ou sur des amines grasses, des phénols substitués (notamment des alkylphénols ou des arylphénols), des sels d'esters

d'acides sulfosucciniques, des dérivés de la taurine (notamment des alkyltaurates), des esters phosphoriques d'alcools ou de phénols polyoxyéthylés, des esters d'acides gras et de polyols, les dérivés à fonction sulfates, sulfonates et phosphates des composés précédents. La présence d'au moins un agent tensioactif est généralement indispensable lorsque le composé et/ou le support inerte ne sont pas solubles dans l'eau et que l'agent vecteur de l'application est l'eau.

Ainsi donc, les compositions à usage agricole selon l'invention peuvent contenir les matières actives selon l'invention dans de très larges limites, allant de 0,05 % à 95 % (en poids). Leur teneur en agent tensio-actif est avantageusement comprise entre 5 % et 40 % en poids.

Ces compositions selon l'invention sont elles-mêmes sous des formes assez diverses, solides ou liquides.

Comme formes de compositions solides, on peut citer les poudres pour poudrage (à teneur en composé pouvant aller jusqu'à 100 %) et les granulés, notamment ceux obtenus par extrusion, par compactage, par imprégnation d'un support granulé, par granulation à partir d'une poudre (la teneur en composé dans ces granulés étant entre 0,5 et 80 % pour ces derniers cas), les comprimés ou tablettes effervescentes.

Le peptide selon l'invention peuvent encore être utilisés sous forme de poudres pour poudrage; on peut aussi utiliser une composition comprenant 50 g de matière active et 950 g de talc; on peut aussi utiliser une composition comprenant 20 g de matière active, 10 g de silice finement divisée et 970 g de talc; on mélange et broie ces constituants et on applique le mélange par poudrage.

Comme formes de compositions liquides ou destinées à constituer des compositions liquides lors de l'application, on peut citer les solutions, en particulier les concentrés solubles dans l'eau, les concentrés émulsionnables, les émulsions, les suspensions concentrées, les aérosols, les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser), les pâtes, les gels.

Les concentrés émulsionnables ou solubles comprennent le plus souvent 10 à 80 % de matière active, les émulsions ou solutions prêtes à l'application contenant, quant à elles, 0,001 à 20 % de matière active.

En plus du solvant, les concentrés émulsionnables peuvent contenir quand c'est nécessaire, 2 à 20 % d'additifs appropriés comme les stabilisants, les agents tensio-actifs, les agents de pénétration, les inhibiteurs de corrosion, les colorants ou les adhésifs précédemment cités.

A partir de ces concentrés, on peut obtenir par dilution avec de l'eau des émulsions de toute concentration désirée, qui conviennent particulièrement à l'application sur les cultures.

A titre d'exemple, voici la composition de quelques concentrés émulsionnables :

Exemple CE 1 :

	- matière active	400 g/l
5	- dodécylbenzène sulfonate alcalin	24 g/l
	- nonylphénol oxyéthylé à 10 molécules	
	d'oxyde d'éthylène	16 g/l
	- cyclohexanone	200 g/l
	- solvant aromatique	q.s.p. 1 litre

10

Selon une autre formule de concentré émulsionnable, on utilise :

Exemple CE 2

15	- matière active	250 g
	- huile végétale époxydée	25 g
	- mélange de sulfonate d'alcoylaryle et	
	d'éther de polyglycol et d'alcools gras	100 g
	- diAndhylformamide	50 g
20	- xylène	575 g

Les suspensions concentrées, également applicables en pulvérisation, sont préparées de manière à obtenir un produit fluide stable ne se déposant pas et elles contiennent habituellement de 10 à 75 % de matière active, de 0,5 à 15 % d'agents tensioactifs, de 0,1 à 10 % d'agents thixotropes, de 0 à 10 % d'additifs appropriés, comme des anti-mousses, des inhibiteurs de corrosion, des stabilisants, des agents de pénétration et des adhésifs et, comme support, de l'eau ou un liquide organique dans lequel la matière active est peu ou pas soluble : certaines matières solides organiques ou des sels minéraux peuvent être dissous dans le support pour aider à empêcher la sédimentation ou comme antigels pour l'eau.

30

A titre d'exemple, voici une composition de suspension concentrée :

Exemple SC 1 :

35	- matière active	500 g
	- phosphate de tristyrylphénol polyéthoxylé	50 g
	- alkylphénol polyéthoxylé	50 g
	- polycarboxylate de sodium	20 g

- éthylène glycol	50 g
- huile organopolysiloxanique (antimousse)	1 g
- polysaccharide	1,5 g
- eau	316,5 g

5

Les poudres mouillables (ou poudre à pulvériser) sont habituellement préparées de manière qu'elles contiennent 20 à 95 % de matière active, et elles contiennent habituellement, en plus du support solide, de 0 à 30 % d'un agent mouillant, de 3 à 20 % d'un agent dispersant, et, quand c'est nécessaire, de 0,1 à 10 % d'un ou plusieurs stabilisants et/ou autres additifs, comme des agents de pénétration, des adhésifs, ou des agents antimottants, colorants, etc...

Pour obtenir les poudres à pulvériser ou poudres mouillables, on mélange intimement les matières actives dans les mélangeurs appropriés avec les substances additionnelles et on broie avec des moulins ou autres broyeurs appropriés. On obtient par là des poudres à pulvériser dont la mouillabilité et la mise en suspension sont avantageuses ; on peut les mettre en suspension avec de l'eau à toute concentration désirée et ces suspensions sont utilisables très avantageusement en particulier pour l'application sur les feuilles des végétaux.

A la place des poudres mouillables, on peut réaliser des pâtes. Les conditions et modalités de réalisation et d'utilisation de ces pâtes sont semblables à celles des poudres mouillables ou poudres à pulvériser.

A titre d'exemple, voici diverses compositions de poudres mouillables (ou poudres à pulvériser) :

25

Exemple PM 1

- matière active	50%
- alcool gras éthoxylé (agent mouillant)	2,5%
- phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant)	5%
- craie (support inerte)	42,5%

30

Exemple PM 2 :

- matière active	10%
- alcool synthétique oxo de type ramifié, en C13 éthoxylé par 8 à 10 oxyde d'éthylène (agent mouillant)	0,75%
- lignosulfonate de calcium neutre (agent dispersant)	12%
- carbonate de calcium (charge inerte)	q.s.p. 100 %

35

Exemple PM 3 :

Cette poudre mouillable contient les mêmes ingrédients que dans l'exemple précédent, dans les proportions ci-après :

5	- matière active	75%
	- agent mouillant	1,50%
	- agent dispersant	8%
	- carbonate de calcium (charge inerte)	q.s.p. 100%

10 Exemple PM 4 :

	- matière active	90%
	- alcool gras éthoxylé (agent mouillant)	4%
	- phényléthylphénol éthoxylé (agent dispersant)	6%

15 Exemple PM 5 :

	- matière active	50%
	- mélange de tensio-actifs anioniques et non ioniques (agent mouillant)	2,5%
	- lignosulfonate de sodium (agent dispersant)	5%
20	- argile kaolinique (support inerte)	42,5%

Les dispersions et émulsions aqueuses, par exemple les compositions obtenues en diluant à l'aide d'eau une poudre mouillable ou un concentré émulsionnable selon l'invention, sont comprises dans le cadre général de la présente invention. Les émulsions
25 peuvent être du type eau-dans-l'huile ou huile-dans-l'eau et elles peuvent avoir une consistance épaisse comme celle d'une "mayonnaise".

Les composés selon l'invention peuvent être formulés sous la forme de granulés dispersibles dans l'eau également compris dans le cadre de l'invention.

Ces granulés dispersibles, de densité apparente généralement comprise entre
30 environ 0,3 et 0,6 ont une dimension de particules généralement comprise entre environ 150 et 2000 et de préférence entre 300 et 1500 microns.

La teneur en matière active de ces granulés est généralement comprise entre environ 1 % et 90 %, et de préférence entre 25 % et 90 %.

Le reste du granulé est essentiellement composé d'une charge solide et
35 éventuellement d'adjuvants tensio-actifs conférant au granulé des propriétés de dispersibilité dans l'eau. Ces granulés peuvent être essentiellement de deux types distincts selon que la charge retenue est soluble ou non dans l'eau. Lorsque la charge est hydrosoluble, elle peut être minérale ou, de préférence, organique. On a obtenu

d'excellents résultats avec l'urée. Dans le cas d'une charge insoluble, celle-ci est de préférence minérale, comme par exemple le kaolin ou la bentonite. Elle est alors avantageusement accompagnée d'agents tensio-actifs (à raison de 2 à 20 % en poids du granulé) dont plus de la moitié est, par exemple, constituée par au moins un agent

5 dispersant, essentiellement anionique, tel qu'un polynaphtalène sulfonate alcalin ou alcalino terreux ou un lignosulfonate alcalin ou alcalino-terreux, le reste étant constitué par des mouillants non ioniques ou anioniques tel qu'un alcoyl naphtalène sulfonate alcalin ou alcalino-terreux.

Par ailleurs, bien que cela ne soit pas indispensable, on peut ajouter d'autres

10 adjuvants tels que des agents anti-mousse.

Le granulé selon l'invention peut être préparé par mélange des ingrédients nécessaires puis granulation selon plusieurs techniques en soi connues (drageoir, lit fluide, atomiseur, extrusion, etc...). On termine généralement par un concassage suivi d'un tamisage à la dimension de particule choisie dans les limites mentionnées ci-

15 dessus. On peut encore utilisé des granulés obtenus comme précédemment puis imprégnés avec une composition contenant la matière active.

De préférence, il est obtenu par extrusion, en opérant comme indiqué dans les exemples ci-après.

20 Exemple GD1 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange 90 % en poids de matière active et 10 % d'urée en perles. Le mélange est ensuite broyé dans un broyeur à broches. On obtient une poudre que l'on humidifie avec environ 8 % en poids d'eau. La poudre humide est extrudée dans une extrudeuse à rouleau perforé. On obtient un granulé qui est séché,

25 puis concassé et tamisé, de façon à ne garder respectivement que les granulés d'une dimension comprise entre 150 et 2000 microns.

Exemple GD2 : Granulés dispersibles

Dans un mélangeur, on mélange les constituants suivants :

30	- matière active	75%
	- agent mouillant (alkylnaphtalène sulfonate de sodium)	2%
	- agent dispersant (polynaphtalène sulfonate de sodium)	8%
	- charge inerte insoluble dans l'eau (kaolin)	15%

35 Ce mélange est granulé en lit fluide, en présence d'eau, puis séché, concassé et tamisé de manière à obtenir des granulés de dimension comprise entre 0,15 et 0,80 mm.

Ces granulés peuvent être utilisés seuls, en solution ou dispersion dans de l'eau de manière à obtenir la dose cherchée. Ils peuvent aussi être utilisés pour préparer des

associations avec d'autres matières actives, notamment antibactériens, ces dernières étant sous la forme de poudres mouillables, ou de granulés ou suspensions aqueuses.

En ce qui concerne les compositions adaptées au stockage et au transport, elles contiennent plus avantageusement de 0,5 à 95 % (en poids) de substance active.

5

L'invention concerne également un procédé pour le traitement antibactérien thérapeutique pour l'homme ou l'animal par administration d'une dose efficace du peptide selon l'invention, sous forme libre ou, le cas échéant, sous forme de sels d'addition avec un acide, de sels Andalliques ou de sels d'addition avec une base pharmaceutiquement acceptables, à l'état pur ou sous forme d'une composition dans laquelle il est associé à tout autre produit pharmaceutiquement compatible, pouvant être inerte ou physiologiquement actif. Les médicaments selon l'invention peuvent être administrés par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

10

Comme compositions solides pour administration orale peuvent être utilisés des comprimés, pilules, poudres (notamment dans des capsules de gélatine ou des cachets) ou granulés. Dans ces compositions, le produit actif selon l'invention est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes, tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tel que le stéarate de magnésium ou la talc, un colorant, un enrobage(dragées) ou un vernis.

15

20

Comme compositions liquides pour administration orale, on peut utiliser des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops, et des élixirs pharmaceutiquement acceptable contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants..

25

Les compositions stériles pour administration parentérale peuvent être de préférence des solutions aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on peut employer l'eau, le propylèneglycol, un polyéthylène glycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, des esters organiques convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de différentes façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent être également préparées sous forme de compositions solides stériles, qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans un milieu stérile injectable.

30

35

Les compositions pour administration rectale sont les suppositoires ou les capsules rectales, qui contiennent, outre le peptide actif, des excipients tels que le beurre de cacao, des glycérides semi-synthétiques ou des polyéthylène glycols.

5 Les compositions stériles pour administration topique peuvent être par exemple des crèmes, pommades, lotions, collyres, collutoires, gouttes nasales ou aérosols.

En thérapeutique humaine, le peptide selon l'invention est particulièrement utile dans les traitement antibactériens. Les doses dépendent de l'effet recherché et de la durée du traitement; elles sont généralement comprises entre 50 et 1000 mg par jour par voie orale pour un adulte en une ou plusieurs perises.

10 D'une façon générale, le médecin déterminera la posologie qu'il estime la plus appropriée en fonction de l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

Les exemples suivants sont donnés à titre non limitatif illustrent les compositions selon l'invention.

15 Exemple A:

On prépare, selon la technique habituelle, des comprimés dosés à 50 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

	- peptide androctonine M1	50 mg
	- amidon	60 mg
20	- lactose	50 mg
	- stéarate de magnésium	2 mg

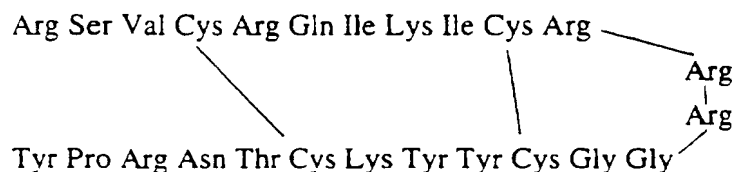
Exemple B:

On prépare une solution injectable contenant 20 mg de peptide actif ayant la composition suivante:

25	- peptide androctonine M 2	22,4 mg
	- eau distillée	q.s.p. 2 cm ³

REVENDICATIONS

1. Peptide de formule:



2. Composition antibactérienne, caractérisée en ce qu'elle contient comme matière active un peptide selon la revendication 1.

3. Composition selon la revendication 2, utilisable pour la protection des plantes contre les bactéries pathogènes.

4. Composition selon la revendication 2, utilisable pour le traitement thérapeutique du corps humain ou animal.

5. Composition antifongique, caractérisée en ce qu'elle contient comme matière active un peptide selon la revendication 1.

6. Composition selon la revendication 5, utilisable pour la protection des plantes contre les bactéries pathogènes.

7. Composition selon la revendication 5, utilisable pour le traitement thérapeutique du corps humain ou animal.

8. Procédé pour la protection des plantes contre les maladies bactériennes, caractérisé en ce qu'on applique, comme matière active, un peptide selon la revendication 1.

9. Procédé pour la protection des plantes contre les maladies fongiques, caractérisé en ce qu'on applique, comme matière active, un peptide selon la revendication 1.

10. Procédé de préparation du peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que, successivement:

16

- a) on prélève de l'hémolymphe du scorpion *Androctonus australis* ;
- b) on effectue l'extraction par mise en contact d'hémolymphe ou d'un broyat de *Androctonus australis* obtenues précédemment avec un milieu acide à neutre sous agitation, puis par centrifugation;
- 5 c) on fractionne le surnageant avec séparation par lavage des molécules hydrophiles et élution des molécules hydrophobes par des éléments appropriés, sur colonne séparatrice;
- d) on purifie les extraits;
- e) on effectue le séquençage.

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/435, A01N 63/02, A61K 38/17	A3	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/30082
		(43) Date de publication internationale: 21 août 1997 (21.08.97)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00295

(22) Date de dépôt international: 17 février 1997 (17.02.97)

(30) Données relatives à la priorité:
96/02168 16 février 1996 (16.02.96) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC AGROCHIMIE [FR/FR]; 14/20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BULET, Philippe [FR/FR]; 11, rue du Cottage, F-67550 Vendenheim (FR). HETRU, Charles [FR/FR]; 5, rue des Moineaux, F-67400 Illkirch Graffenstaden (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR]; 5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR). SABATIER, Laurence [FR/FR]; 8, rue des Vergers, F-67120 Molsheim (FR).

(74) Mandataire: CHRETIEN, François; Rhône-Poulenc Agrochimie - D.P.I., 14/20, rue Pierre-Baizet, F-69009 Lyon (FR).

(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.*

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 25 septembre 1997 (25.09.97)

(54) Title: ANTIFUNGIC AND ANTIBACTERIAL PEPTIDE

(54) Titre: PEPTIDE ANTIBACTERIEN ET ANTIFONGIQUE

(57) Abstract

The invention discloses an antibacterial and antifungic peptide having the formula (I).

(57) Abrégé

Peptide antibactérien et antifongique de la formule (I), utilisable comme antibactérien et antifongique.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brézil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 97/00295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/435 A01N63/02 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 194, no. 1, 15 July 1993, ORLANDO, FL US, pages 17-22, XP002018845 COCIANCICH E.A.: "Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins " see the whole document --- -/-	1-10



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 July 1997

Date of mailing of the international search report

07.08.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Groenendijk, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No.
PCT/FR 97/00295

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 47, 22 November 1996, MD US, pages 29537-29544, XP002036559 EHRET-SABATIER E.A.: "CHARACTERIZATION OF NOVEL CYSTEINE-RICH ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM SCORPION BLOOD" see the whole document -----</p>	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Requête Internationale No
PCT/FR 97/00295

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07K14/435 A01N63/02 A61K38/17

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 194, no. 1, 15 Juillet 1993, ORLANDO, FL US, pages 17-22, XP002018845 COCIANCICH E.A.: "Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins " voir le document en entier --- -/--	1-10

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou sous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 Juillet 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

07.08.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Groenendijk, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

lande Internationale No
PCT/FR 97/00295

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie *	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
P,X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 271, no. 47, 22 Novembre 1996, MD US, pages 29537-29544, XP002036559 EHRET-SABATIER E.A.: "CHARACTERIZATION OF NOVEL CYSTEINE-RICH ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM SCORPION BLOOD" voir le document en entier -----</p>	1-10